自桑兰叶甲分离出的一种微孢子虫（Mic-Ⅰ）的研究

方定坚，杨 琼，邹宇晓，郑祥明，黄炳辉
（广东省农业科学院蚕业研究所，广州 510610）

摘要：从广州郊区罗岗的桑园及菜地捕捉到的桑兰叶甲 *Mimastra cyanura* Hope 成虫体中分离到一种卵圆形的微孢子虫（简称 Mic-Ⅰ）。孢子大小为（3.35±0.46）×（1.96±0.17）μm；孢子具单核、双核两种类型；极丝 10～11 圈；孢子表面抗原的血清学类型与家蚕微粒子虫 *Nosema bombycis* 孢子不同；在家蚕 *Bombyx mori* 体内以两种不同的生活史发育，发育过程符合变态孢虫属 *Vairimorpha* 微孢子虫发育特征。Mic-Ⅰ微孢子虫对家蚕具强病原性，对斜纹夜蛾 *Prodenia litura* 和小菜蛾 *Plutella xylostella* 也有感染能力。

关键词：桑兰叶甲；家蚕；微孢子虫；变态孢虫属
中图分类号：Q959.115.92 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）02-0182-06

A microsporidium（Mic-I）isolated from *Mimastra cyanura* Hope

FANG Ding-Jian，YANG Qiong，ZOU Yu-Xiao，ZHENG Xiang-Ming，HUANG Bing-Hui（Sericultural Research Institute，Guangdong Academy of Agricultural Sciences，Guangzhou 510610，China）

Abstract：A microsporidium（Mic-Ⅰ）was isolated from *Mimastra cyanura* Hope caught from mulberry fields and vegetable plots in the suburban in Guangzhou. The spores were（3.35±0.46）×（1.96±0.17）μm in size，oval in shape. It had two types of nucleus，mono- and bi-nucleus，and 10～11 polar filament coils. The serum type of Mic-Ⅰ was different from that of *Nosema bombycis*. It developed with two types of life cycles in larvae of the silkworm，*Bombyx mori*，had the developmental characteristics of the genus *Vairimorpha* and should be classified to *Vairimorpha*. It had very strong infectivity to *Bombyx mori*，and also had infectivity to *Prodenia litura* and *Plutella xylostella*.

Key words：*Mimastra cyanura* Hope；*Bombyx mori*；microsporidium；*Vairimorpha*

微孢子虫是专性寄生的单细胞真核原生动物。一般侵袭一种或同科的数种昆虫，但亦有超科超目感染，故自然界昆虫间存在着复杂的微孢子虫交叉感染网。微孢子虫对各种昆虫的感染能力有着明显的差异，有的不能感染，有的只具食下感病能力，但有的则兼具食下传染和经卵胚种传染的能力。近年来，各国学者纷纷开展昆虫微孢子虫的研究。Yokota 等（1997）从菜粉蝶 *Pieris rapae* 和美国白蛾 *Hyphantria cunea* 分离到一种梅氏微粒子虫 *Nosema mesnili*，认为它对鳞翅目昆虫具强病原性。廖森泰等（1992）从蓝叶甲 *Phyllobrotica armte* 分离到一种大型微粒子虫 *Nosema* sp. 对家蚕 *Bombyx mori* 有强的食下传染，感染家蚕后可低频率经卵传染。万永继等（1995）从家蚕体中分离到一种只寄生于家蚕中肠上皮组织并无胚种传染的内网孢虫属 *Endoreticulatus* 微孢子虫。王万成等（1992）对玉米螟病原微孢子虫进行研究。马跃等（1991）开展微孢子虫治蝗研究取得突破性进展。本文中作者报道鞘翅目昆虫桑兰叶甲 *Mimastra cyanura* Hope 的一种病原微孢子虫的生物学特性。

1 材料和方法

1.1 材料

原代桑兰叶甲微孢子虫 Mic-Ⅰ孢子：从广州郊区罗岗桑园及菜地捕捉的桑兰叶甲成虫体中分离，纯化后备用。家蚕微粒子虫 *Nosema bombycis*（下略为 *Nb*）孢子：广东省农业科学院蚕业研究所蚕病室继代保存株。

1.2 方法

基金项目：“九五”国家重点科技攻关（96-616-02-03-01）和广东省科技攻关（2KM03204N）
第一作者简介：方定坚，男，生于 1934 年 4 月，学士，研究员，研究方向为昆虫生理病理，E-mail：cbyjs@163.com
收稿日期 Received：2000-08-22；接受日期 Accepted：2001-03-02

1.2.1 孢子外部形态观察：将提纯后的 Mic-Ⅰ孢子置光学显微镜观察孢子外部形态，以测微尺测量孢子大小。

1.2.2 孢子表面抗原血清学类型的比较：采用致敏胶乳玻片凝集法，以抗 *Nb* IgG 致敏的直径0.81 μm 胶乳粒子为检测抗体，以提纯后的 Mic-Ⅰ孢子为检测抗原，*Nb* 孢子为阳性孢子抗原，检测时抗体抗原各取一滴滴于干净的载玻片上，搅匀后盖上盖玻片，置 27℃ 10 min，600 倍光学显微镜下观察孢子与胶乳粒子反应情况。

1.2.3 孢子超微结构观察：将纯化的孢子包埋于琼脂糖中，戊二醛-锇酸双固定，按常规方法超薄切，以醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色后，于日立 EM-400 型透射电子显微镜下观察，显微摄影。

1.2.4 微孢子虫生活史的观察：2 龄起蚕添食 10^7 粒/mL Mic-Ⅰ孢子，6 h 后第 1 次取后部中肠涂片，以后每天涂片一次，至新孢子形成。涂片用甲醇固定后，以 Giemsa 染色，600 倍光学显微镜下观察。

1.2.5 Mic-Ⅰ对家蚕病原性调查：食下传染：将 Mic-Ⅰ孢子作为供试材料，*Nb* 孢子为对照。以 10^7 粒/mL ~ 10^3 粒/mL 孢子 10 倍系列稀释液分别给 3 龄起蚕添食 12 h，然后正常饲养，10 天后逐条蚕镜检，调查感染头数。按 Reed-Muench 法统计感染中量 IC_{50}。

寄生部位：将浓度为 10^7 粒/mL Mic-Ⅰ孢子给 2 龄起蚕添食，连续添食 12 h。分别于接种后的第 5、10 天解剖蚕体，取各种组织以无菌水冲洗数次，涂片镜检有无孢子，调查感染部位。

胚种传染：4 龄起蚕添食 10^6 粒/mL Mic-Ⅰ孢子，常规饲养，单蛾制种，将镜检有多量孢子母蛾所产的卵进行试验。催青，即时浸酸。孵化后每卵圈分成 2 份，分别在蚁蚕和 3 龄蚕期调查。检查时将待检样品研磨过滤，滤液离心后镜检有无孢子存在，判别胚种传染性。

1.2.6 Mic-Ⅰ对几种昆虫感染能力调查：将浓度为 10^7 粒/mL Mic-Ⅰ孢子分别添食家蚕、斜纹夜蛾 *Prodenia litura*、小菜蛾 *Plutella xylostella*、甜菜夜蛾 *Laphygma exigua* 和一种尺蠖科 Geometridae 昆虫的 3 龄幼虫，接种后第 10 天逐条虫镜检，调查各种昆虫感染发病情况。

2 结果

2.1 孢子形态大小

在光学显微镜下，Mic-Ⅰ孢子为卵圆型，长轴与 *Nb* 孢子相近，短轴稍窄，孢子群体大小形状差异不明显，新鲜孢子折光性强（表 1 和图版Ⅰ：1，2）。Mic-Ⅰ孢子经蚕体多次继代后，外部形态无明显变化。

表 1 Mic-Ⅰ孢子与 *Nb* 孢子的形态大小

Table 1 The shape and size of spores of Mic-Ⅰ and *Nb*

	Mic-Ⅰ孢子 Mic-Ⅰ spores	*Nb* 孢子 *Nb* spores
形态 shape	卵圆形 oval	卵圆形 oval
长轴 length（μm）	3.35 ± 0.46	3.45 ± 0.15
短轴 width（μm）	1.96 ± 0.17	2.25 ± 0.15
长短轴比 length/width	1.71	1.53
体积 volume（μm^3）	6.73	9.13

孢子体积 = π/6 × 长轴 × 短轴^2（volume = π/6 × length × width^2）

2.2 Mic-Ⅰ孢子表面抗原的血清学类型

在光学显微镜下，抗 *Nb* IgG 致敏的胶乳粒子与 Mic-Ⅰ孢子分散分布，无凝集现象；而胶乳粒子与 *Nb* 孢子紧密结合，呈强凝集现象。说明 Mic-Ⅰ与 *Nb* 两种孢子表面抗原的血清学类型是不同的（图版Ⅰ：3、4）

2.3 孢子的超微结构

Mic-Ⅰ孢子具单核、双核二种类型；孢壁较薄；极膜层由二部分形成，前部由致密排列的膜状物围成一封闭锥体，后部由疏松而平整的薄片膜迭成，膜间层次分明；多数孢子的极丝为 10 ~ 11 圈；极丝倾斜角在 45°以上；后极泡较小，多为近球形，有时也可见后极泡沿壁附着 1 ~ 2 个小泡囊（图版Ⅰ：5、6）。

2.4 Mic-Ⅰ微孢子虫生活史

25℃条件下，家蚕食下 10^7 粒/mL Mic-Ⅰ孢子后 6 h 可在中肠后部细胞的细胞质中见到双核孢原质（图版Ⅱ：1）；进入裂殖体分裂阶段以后，以两种不同的生活史发育，称Ⅰ、Ⅱ型。

Ⅰ型：裂殖体以二分裂进行增殖，裂殖体近圆形，具双核。接种后 24 h 为裂殖体分裂的第 1 个高峰（图版Ⅱ：2）；48 h 在裂殖体细胞质一端开始出现染不上色的高折曲率小球，形成双核纺锤形产孢体（图版Ⅱ：3）；此时的产孢体一分为二，形成 2 个双核的梨形短极丝孢子（图版Ⅱ：4）；48 ~ 72 h 短极丝孢子发芽形成二次感染体（图版Ⅱ：5）；二次感染体侵入相邻细胞后形成裂殖体，72 ~ 96 h 裂殖体大量增殖，此时为裂殖体第二次分裂高峰

（图版Ⅱ：6）；96～120 h产孢体大量形成，产孢体按二分裂法增殖，形成2个双核卵圆形长极丝孢子（图版Ⅱ：7）；接种后6天在宿主中肠细胞的细胞质可见大量分散的双核卵圆形成熟孢子（图版Ⅱ：8）。这种发育类型符合微粒子属 *Nosema* 的特征。

Ⅱ型：24 h可见形态不规则的大型双核、四核裂殖体（图版Ⅱ：9，10）；48～72 h四核裂殖体进一步核分裂，形成大圆型细胞质着色深的八核裂殖体（图版Ⅱ：11）；72～96 h核呈桑椹形的近圆形双核、四核产孢体开始形成（图版Ⅱ：12）；96～120 h四核、八核产孢体大量出现，八核产孢体具典型的泛孢子膜（图版Ⅱ：13，14）；120～144 h可见八核产孢体分裂形成8个单核的孢母细胞（图版Ⅱ：15）；不久，孢母细胞形成单核短卵圆形成熟孢子，8个单核孢子聚在一起成为孢子团（图版Ⅱ：16）。这种发育类型符合泰罗汉孢虫属 *Thelohania* 的特征。

25℃条件下，Mic-Ⅰ微孢子虫完成一世代需要的时间为5～6天。

2.5 对家蚕的病原性

食下传染：接种后第10天，将蚕逐条镜检，调查染病蚕数。按Reed-muench法计算出Mic-Ⅰ微孢子虫对3龄起蚕的感染中量 IC_{50} 为 1.48×10^3 粒/mL孢子，而 *Nb* 对三龄起蚕的 IC_{50} 为 7.94×10^3 粒/mL孢子。说明Mic-Ⅰ微孢子虫对家蚕的食下感染能力比 *Nb* 还强。

寄生部位：接种后第5天，解剖蚕体各种组织镜检，可在中肠、马氏管检到孢子；接种后第10天镜检，在中肠、马氏管、脂肪体、气管丛、血细胞等组织均检到大量孢子。可见，Mic-Ⅰ微孢子虫对家蚕为全身性感染。

胚种传染：将严重感染Mic-Ⅰ微孢子虫的家蚕母蛾所产的10个卵圈各分为2份，常规处理，分别在蚁蚕和三龄蚕期调查。结果10个卵圈在不同龄期均检出孢子。说明Mic-Ⅰ微孢子虫对家蚕具胚种传染能力，且蛾圈胚种传染率达100%。

2.6 Mic-Ⅰ微孢子虫对几种昆虫的感染能力

在5种供试昆虫中，Mic-Ⅰ微孢子虫对家蚕 *Bombyx mori*、斜纹夜蛾 *Prodenia litura*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 均有经口感染能力，感染率分别为100%、30.4%、40.0%，而对甜菜夜蛾 *Laphygma exigua* 和一种尺蠖科Geometridae昆虫无感染能力。

3 讨论

Mic-Ⅰ微孢子虫孢子具单核、双核二种类型，极丝为10～11圈；*Nb* 孢子只具双核，极丝为12～13圈。说明了二种孢子的超微结构存在着明显的差异。另外，二种孢子的表面抗原也完全不同。综上结果表明：Mic-Ⅰ和 *Nb* 孢子为两种不同的微孢子虫。

据国际微孢子虫分类标准，同时以微粒子属 *Nosema* 及泰罗汉孢虫属 *Thelohania* 发育模式生长发育的微孢子虫应为变态孢虫属 *Vairimorpha*。Pilley（1965）在建立 *Vairimorpha* 时，描述该属特征为二型性发育，在常温情况下只是出现二分裂和2个孢母细胞的双核孢子生殖；低温条件下，则同时发生多分裂、8个孢母细胞的单核孢子生殖和二分裂、双孢母细胞生殖。本研究观察到Mic-Ⅰ微孢子虫发育模型，符合Pilley建立 *Vairimorpha* 时描述该属在低温时的发育特征，故应归于 *Vairimorpha*。至于Pilley所描述该属温度依赖性问题，即只有在低温下才同时出现包括 *Nosema* 型和 *Thelohania* 型两种孢子生殖类型，本研究结果与其有所不同。给家蚕接种Mic-Ⅰ孢子后，在25℃条件下饲养，就出现两种孢子生殖类型，这与日本报道的 *Vairimorpha* 微孢子虫NIS-M11的情况相似（Tomoyoshi *et al*.，1997）。对于 *Vairimorpha* 孢子生殖温度依赖性问题，需进一步探讨。

Mic-Ⅰ微孢子虫是从鞘翅目昆虫桑兰叶甲分离出来的，它原来的宿主与鳞翅目昆虫家蚕处于不同的分类位置。另外，各自的病原微孢子虫也处于不同的分类位置，Mic-Ⅰ为 *Vairimorpha* 微孢子虫，*Nb* 为 *Nosema* 微孢子虫。本研究结果表明：Mic-Ⅰ微孢子虫对家蚕的病原性比传统的家蚕 *Nb* 还强，同时，对斜纹夜蛾、小菜蛾也有感染能力，说明了各种微孢子虫对昆虫病原性存在着相当复杂的关系，寄主范围也很难明确，其中的奥妙有待进一步研究。对家蚕等经济昆虫的微粒子病防疫和检疫也要增加新的内容。

参 考 文 献（References）

Liao S T，Lu K M，Nong C Z，Fang D J，Zheng X M，1992. Studies on the character of a microsporidian parasite from *Phyllobrotica armta* Baly and pathogenicity to the silkworm，*Bombyx mori*. *Journal of South China Agricultural University*，13（4）：150－153.［廖森泰，卢铿明，农朝志，方定坚，郑祥明，1992. 蓝叶甲微孢子虫的特征及其对

家蚕病原性研究．华南农业大学学报，1992，13（4）：150－153］

Ma Y，Pan J M，Zhang Z R，Ma A S，1991．Biocontrol of grasshoppers in Neimenggu with *Nosema locustae*．*Grassland of China*，13（1）：64－67．［马跃，潘建梅，张卓然，马爱实，1991 蝗虫微孢子虫防治内蒙草原蝗虫研究．中国草地，13（1）：64－67］

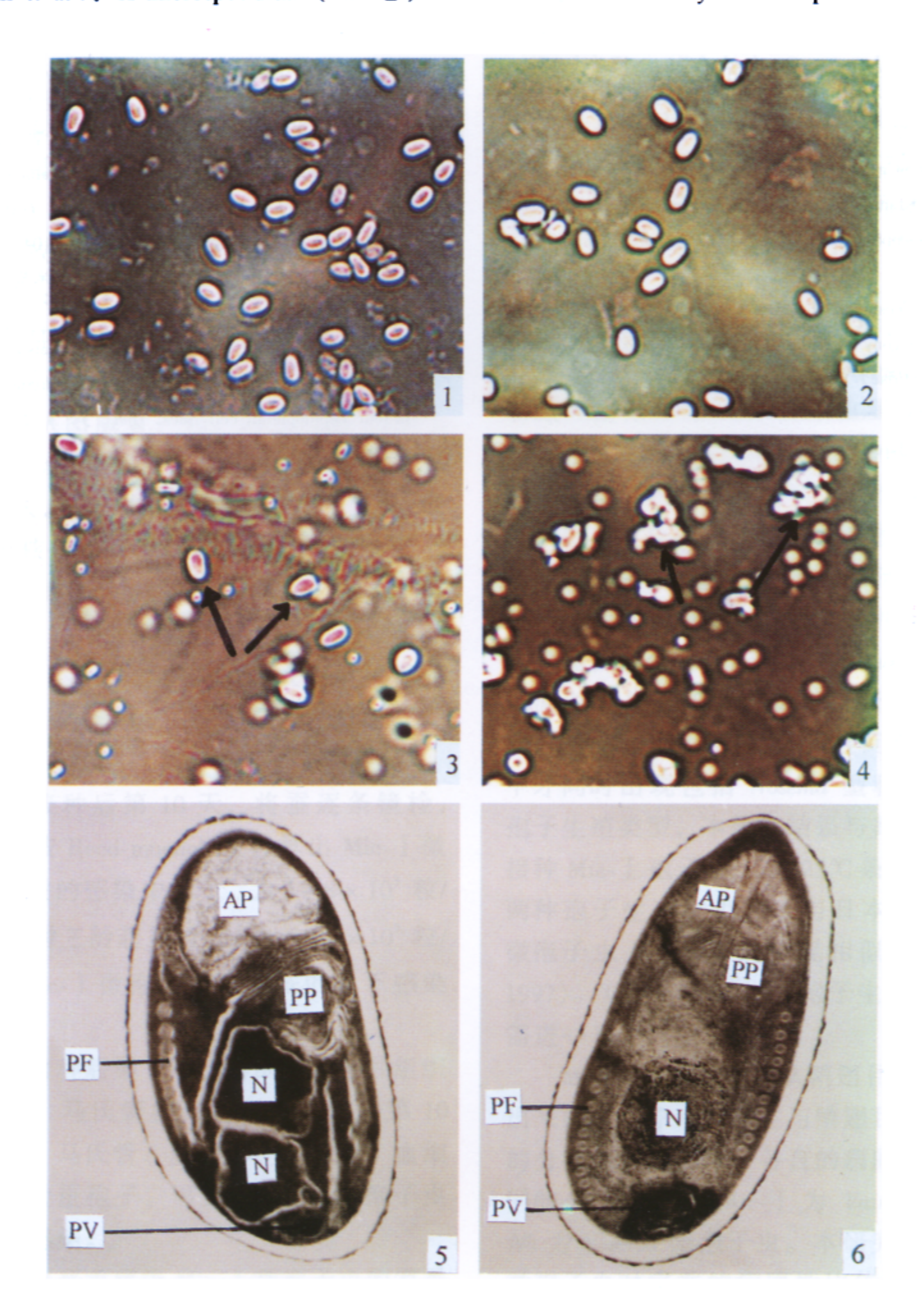
Pilley，B M.，1976．A new genus，*Vairimorpha*（Protozoa：Microsporida），for *Nosema necatrix* Kramer 1965：pathogenicity and life cycle in *Spodoptera exempta*（Lepicoptera：Noctuidae）．*J．Inverteb．Pathol．*，28：177－183．

Tomoyoshi I，Hidetoshi I，Yoshinori H，Yuji K，Koji O，Syoji H，Tadashi I，Ren I，1997．Sporogony of a microsporidium，*Nosema* sp．NIS-M11（Microspora：Nosematidae）in larvae of the silkworm，*Bombyx mori* raised under two distinct levels of temperature．*J．Seric．Sci．Jpn．*，66（6）：445－452（Japan）

Wan Y J，Zhang L，Chen Z P，Pan M H，Du Y，Ao M J，Yang B，1995．Study of a pathogenic microsporidium SCM_7（*Endoreticulatus* sp.）isolated from the larvae of silkworm，*Bombyx mori*．*Acta Sericologica Sinica*，21（3）：168－172．［万永继，张琳，陈祖佩，潘敏慧，杜云，敖明军，杨彪，1995．家蚕病原性微孢子虫 SCM7（*Endoreticulatus* sp.）的分离和研究．蚕业科学，21（3）：168－172］

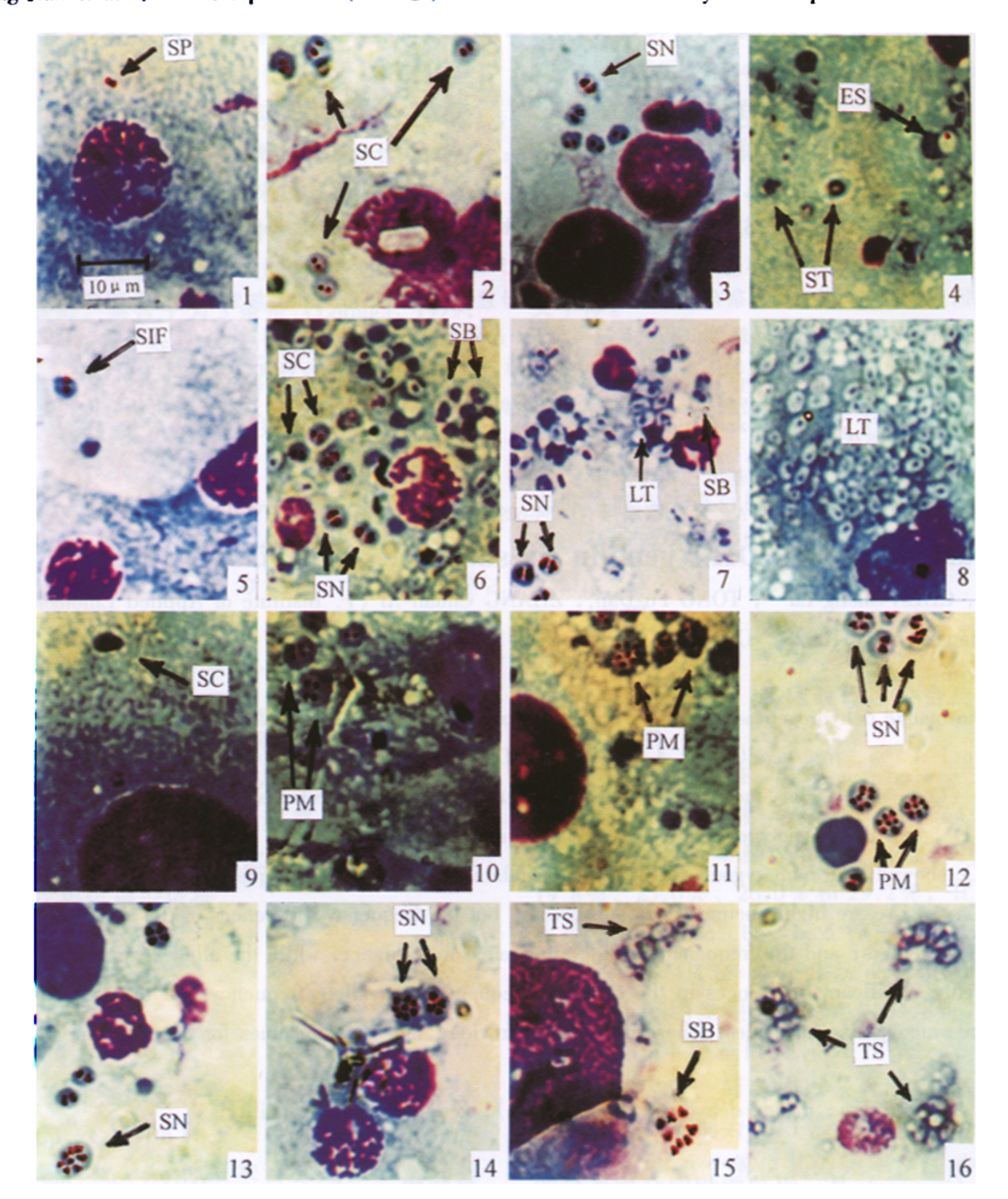
Wang W C，Wen J Z，1992．Comparative pathogenicity of *Nosema furnacalis* and *Nosema pyrausta* in Asian corn borer，*Ostrinia furnacalis*．*Chinese Journal of Biological Control*，8（3）：104－106．［王万成，问锦曾，1992．两种玉米螟微孢子虫对玉米螟致病性的比较．生物防治通报，8（3）：104－106］

Yokota，Satoko，Chisa Y，Takeshi K，Syoji H，Katsuo T，1997．Continuous culture of *Nosema mesnili* NM-HCA8801（Microsporida：Nosematidae）in four Lepidopteran cell lines．*Jpn．J．Appl．Entomol．Zool．*，4（3）：147－152．



1. 桑兰叶甲微孢子虫 Mic-Ⅰ孢子（spores of Mic-Ⅰ）（1 200×）
2. 家蚕微粒子虫孢子（spores of *Nosema bombycis*）（1 200×）
3. 抗 *Nb* IgG 致敏的胶乳粒子与 Mic-Ⅰ孢子无凝集反应（no agglutination reaction between latex and Mic-Ⅰ）（1 200×）
4. 抗 *Nb* IgG 致敏的胶乳粒子与 *Nb* 发生凝集反应（agglutination reaction between latex and *Nb*）（1 200×）
5. Mic-Ⅰ双核孢子（binuclear spore of Mic-Ⅰ）（18 000×）
6. Mic-Ⅰ单核孢子（mononuclear spore of Mic-Ⅰ（18 000×）

AP：前部极膜层 anterior polaroplast；PP：后部极膜层 posterior polaroplast；N：核 nucleus；PF：极丝 polar filament；PV：后极泡 posterior vacuole



桑兰叶甲微孢子虫在家蚕体中的生活史 life cycle of Mic-Ⅰ in silkworm larvae (Giemsa 染色 stained with Giemsa; 标尺 bar: 10 μm)

1～8. *Nosema* 型发育周期 life cycle of *Nosema* type 1: 6 h 宿主中肠后部细胞的细胞质中的双核孢原质 binuclear sporoplasms in cytoplasm of postmidgut cell, 6 h p.i. 2: 24 h 双核裂殖体及以二分裂进行增殖的裂殖体 binuclear schizonts and dividing schizonts by binary division, 24 h p.i. 3: 48 h 产孢体开始出现 sporonts appeared, 48 h p.i. 4: 48～72 h 短极丝孢母细胞和发芽后的孢子空壳 sporoblasts of ST and ES, 48～72 h p.i. 5: 48～72 h 短极丝孢子发芽形成的二次感染体侵入相邻组织细胞 SIF formed by ST invading adjacent organism cells, 48～72h p.i. 6: 72～96 h 裂殖体大量增殖 schizonts multiple largely, 72～96 h p.i. 7: 72～96 h 产孢体二分裂形成 2 个双核长极丝孢子 sporonts divided into 2 binuclear LT, 72～96 h p.i. 8: 120～144 h 大量成熟的长极丝孢子 mature LT in cytoplasm of midgut cells, 120～144 h p.i.

9～16. *Thelohania* 型发育周期 life cycle of *Thelohania* type 9, 10: 24 h 大型双核、四核裂殖体 bi- and tetranuclear schizonts large in size, 24 h p.i. 11: 48～72 h 大型八核裂殖体 octonuclear schizonts large in size, 48～72 h p.i. 12: 72～96 h 核呈桑椹形的双核、四核产孢体 bi- and tetranuclear with nucleus mulberry fruit-shape sporonts, 72～96 h p.i. 13, 14: 96～120 h 四核、八核产孢体 tetra- and octonuclear sporonts, 96～120 h p.i. 15: 96～120 h 八核产孢体分裂形成 8 个单核孢母细胞 octonuclear sporonts divided into eight monoclear sporoblasts, 96～120 h p.i. 16: 120～144 h 八个单核孢子聚积成团 eight monoclear spores connected into group, 120～144 h p.i.

SP: 孢原质 sporoplasm; SC: 裂殖体 schizont; ST: 短极丝孢子 short polar tube type spore; ES: 孢子发芽后的空壳 empty spore; SIF: 二次感染体 second infection form; LT: 长极丝孢子 long polar tube type spore; N: 宿主细胞核 nucleus; PM: 多核裂殖体 plasmodium; SN: 产孢体 sporont; SB: 孢母细胞 sporoblast